



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0030338
(43) 공개일자 2020년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/08 (2006.01) A61K 8/66 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0065 (2013.01)
A61K 8/66 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0109094
(22) 출원일자 2018년09월12일
심사청구일자 2018년09월12일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김용환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
리 탄 마이 팜
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인 무한

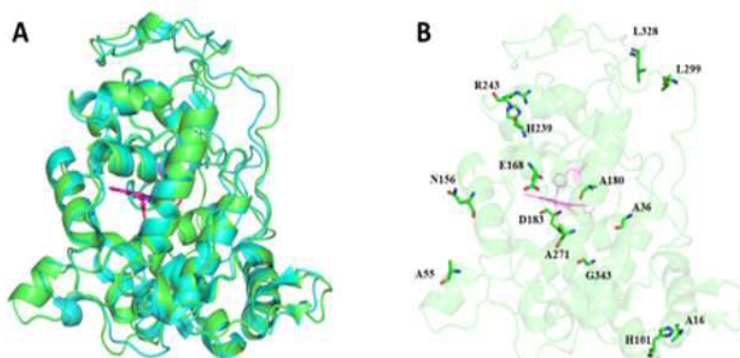
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 리그닌 분해효소 재설계 방법

(57) 요약

리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계; 및 상기 선정된 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 리그닌 퍼옥시데이즈의 제1변이체를 형성하는 단계; 를 포함하고, 상기 제1변이체는, 망간퍼옥시데이즈의 이온결합자리에 형성된 이온결합과 동일한 이온결합을 하나 이상 포함하는 것인, 리그닌 분해효소 재설계 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

A61Q 5/00 (2013.01)

C12Y 111/01014 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711061308

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기후변화대응기술개발

연구과제명 바이오 화학 융복합 기술을 이용한 리그닌의 선택적 해중합을 통한 분해 중간체 생산 원천 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2017.12.20 ~ 2018.03.19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415156022

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오산업핵심기술개발

연구과제명 공정 부산물의 고부가가치 응용제품용 중간 원료화 및 공통 활용 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 국민대학교산학협력단

연구기간 2017.10.01 ~ 2018.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계; 및

상기 선정된 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 제1변이체를 형성하는 단계;

를 포함하고,

상기 제1변이체는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합자리에 형성된 이온결합과 동일한 이온결합을 하나 이상 포함하는 것인,

리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1변이체는, A16E, A55R/N156E 및 H239E 로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1변이체의 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 제2변이체를 생성하는 단계를 더 포함하는, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제2변이체는, A16E-A55R/N156E, A16E-H239E, A55R/N156E-H239E 및 A16E-A55R/N156E-H239E로 이루어진 군 으로부터 선택된 어느 하나인, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계는, 전산모사에 의한 것인, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 6

리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 이온결합자리에 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, Mn P)의 이온결합과 동일한 이온결합이 유도되는, 재설계 리그닌 분해효소.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 재설계 리그닌 분해효소는, A16E, A55R/N156E 및 H239E 중 적어도 어느 하나의 돌연변이를 포함하는 변이 체인, 재설계 리그닌 분해효소.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 변이체는, 리그닌을 분해하는 용도인, 재설계 리그닌 분해효소.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 변이체는, 멜라닌을 분해하는 용도인, 재설계 리그닌 분해효소.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 변이체는, 멜라닌을 탈색하는 용도인, 재설계 리그닌 분해효소.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계 및 상기 선정된 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 리그닌 퍼옥시데이즈 (lignin peroxidase, LIP)의 제1변이체를 형성하는 단계를 포함하고, 상기 제1변이체는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합자리에 형성된 이온결합과 동일한 이온결합을 하나 이상 포함하는 것인, 리그닌 분해효소 재설계 방법이 개시된다.

배경 기술

[0002] 리그닌은 셀룰로오스 헤미셀룰로오스와 함께 지구상에 축적되는 유기물 중 가장 많은 양을 차지하고 잘 분해되지 않는 목재 유기물의 주성분으로, 식물의 중요한 구성요소로서 식물의 2차 세포벽에 존재하며 식물의 나이와 목질 조직이 증가함에 따라 그 함량이 증가하는 특성이 있다. 또, 리그닌은 생물권에서 방향족 탄소의 대부분을 차지하는데, 이러한 방향족 물질은 살아있는 유관속 식물에서 다당류 필라멘트와 섬유의 아교제 역할을 함으로써 조직의 견고함과 강도를 유지하는 역할을 하며, 식물의 물 수송과 미생물 분해에 대한 저항성을 부여하는 작용도 한다는 점에서 중요한 물질이라고 할 수 있다 (Monties and Fukushima, 2001). 식물의 생존에 리그닌이 중요한 역할을 하는 동시에 리그닌의 생분해가 탄소원 순환에 있어 중요하다(Crawford, 1981). 종이나 동물의 사료, 연료의 생산과 같은 산업적 가공 과정에서 리그노셀룰로스 산물(lignocellulosic material)의 효율적인 이용에 있어 큰 방해요인이 되기 때문에 리그닌의 생분해에 대한 관심이 높아졌다(Eriksson, 1990).

[0003] 또, 리그닌 분해함으로써 생성되는 분해산물은 생물펄핑(biopulping), 생물표백(biobleaching)과 같은 제지 및 펄프 산업에 이용될 수 있고, 앞서 언급한 리그노셀룰로스 물질은 사료, 연료 및 기타 유용성화합물로 전환될 수 있으며, 폐수의 오염색 제거나 독성 화합물 처리에 이용될 수도 있다.

[0004] 리그닌은 탄소-탄소(C-C), 에테르(C-O-C)결합 등과 같은 최소한 12가지의 다른 결합으로 이루어진 매우 복잡한 화합물로서, 분해를 위해 세포외적인 산화기작에 의한 탈중합화가 필요하기 때문에 일반적인 효소로는 분해되기 어려우나, 일부 사상성 진균류 특히 백색부후균은 리그닌의 분해능이 높은 것으로 보고되었다.

[0005] 백색부후균에 의한 리그닌과 오염물질 분해시 생성되는 리그닌 분해효소로 공지된 것으로는 리그닌퍼옥시데이즈 (lignin peroxidase, LIP), 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP), 락케이즈(laccase) 등이 있으며 (Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology 41(1):1-17), 이들 효소는 균류의 종류에 따라 다르게 나타나고, 분비된 효소에 따라서 기능의 차이가 있다.

[0006] 리그닌퍼옥시데이즈는 대체로 340여개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 40kDa의 분자량을 갖는 헴단백질 (heme protein)로, 과산화수소(H₂O₂)의 존재하에서 리그닌 분자의 비페놀부위(non-phenol residues)로부터 하나의 전자를 방출시켜 양이온 라디칼(radical)을 만들고, 이러한 라디칼은 산화 반응을 통하여 궁극적으로 리그닌을 산화시키고 탈중합시킨다. 반면에, 망간퍼옥시데이즈와 락케이즈는 단지 리그닌의 페놀 부위를 산화시키는 기능만 수행한다.

[0007] 망간퍼옥시데이즈는 리그닌퍼옥시데이즈와 마찬가지로 리그닌을 분해하는 공통된 퍼옥시데이즈로, 헴단백질을 포함하는 당단백질로 38,000~62,500 Da 정도의 분자량을 갖는 분해효소이다.

[0008] 이들은 대부분 곰팡이로부터 분비되며 자연계에서 리그닌을 분해한다. 그러나 위와 같은 리그닌 분해효소를 이

용하여 리그닌을 분해하는 경우, 분해된 산물이 재증합되어 분해효율이 매우 적다는 단점이 있으며, 바이오연료 제조 등을 위한 대규모 공정에서는 낮은 안정성, 낮은 활성을 나타내며 보결 그룹(prosthetic group)을 필요로 하기 때문에 그 응용이 어려운 것으로 알려져 있다. 특히, 상기 3종의 분해효소 중 가장 높은 활성을 나타내는 리그닌퍼옥시데이즈는 분해활성을 위해서 과산화수소를 필수적으로 요하는 것으로 알려져 있는데, 리그닌퍼옥시데이즈의 헴(Heme) 작용기가 과산화수소에 의해 쉽게 공격을 받아 파괴되어, 빠르게 불활성화되는 낮은 안정성이 상업적 이용의 걸림돌로 작용하고 있었다.

[0009] 또, 산성조건에서 리그닌을 분해하면 분해산물의 재증합속도가 감소하여 결과적으로 리그닌의 분해효율을 증가시킬 수 있으나, 소정의 산성도 이하의 조건에서는 분해효소가 쉽게 해리되어 안정성이 떨어진다는 또 다른 문제점이 발생한다. 따라서, 리그닌 분해효소를 이용하여 리그닌 분해효율을 증가시키기 위해서는, 산성조건에서도 안정적으로 분해활성을 유지할 수 있는 분해효소 및 이를 상업적으로 이용할 수 있는 신규한 리그닌 분해효소의 개발이 필요하며, 이를 이용하여 안정적으로 분해산물을 수급할 수 있는 방안이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제866999호, “리그닌 분해효소의 제조방법” (등록일: 2007.08.07)
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제1168741호, “리그닌 퍼옥시다제의 제조 방법 및 피부와 모발라이트닝에서의 이용 용도” (공개일: 2005.09.05)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계; 및 상기 선정된 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 제1변이체를 형성하는 단계;를 포함하고, 상기 제1변이체는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합자리에 형성된 이온결합과 동일한 이온결합을 하나 이상 포함하는 것인, 리그닌 분해효소 재설계 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 이온결합자리에 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합과 동일한 이온결합이 유도되는, 재설계 리그닌 분해효소를 제공하는 것이다.

[0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계; 및 상기 선정된 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 제1변이체를 형성하는 단계;를 포함하고, 상기 제1변이체는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합자리에 형성된 이온결합과 동일한 이온결합을 하나 이상 포함하는 것인, 리그닌 분해효소 재설계 방법이 제공된다.

[0015] 일 측에 따르면, 상기 제1변이체는, A16E, A55R/N156E 및 H239E 로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0016] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해효소 재설계 방법은, 상기 제1변이체의 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 제2변이체를 생성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0017] 일 측에 따르면, 상기 제2변이체는, A16E-A55R/N156E, A16E-H239E, A55R/N156E-H239E 및 A16E-A55R/N156E-H239E로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계는, 전산모사에 의한 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 이온결합자리에 망간퍼옥

시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합과 동일한 이온결합이 유도되는 재설계 리그닌 분해효소가 제공된다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 재설계 리그닌 분해효소는, A16E, A55R/N156E 및 H239E 중 적어도 어느 하나의 돌연변이를 포함하는 변이체일 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 변이체는, 리그닌을 분해하는 용도일 수 있다.

[0022] 일 측에 따르면, 상기 변이체는, 멜라닌을 분해하는 용도일 수 있다.

[0023] 일 측에 따르면, 상기 변이체는, 멜라닌을 탈색하는 용도일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명을 이용하면 리그닌 분해효소의 이온결합 개수를 증가시키도록 효소를 재설계 할 수 있어, 산성조건에서도 안정성이 증대된 리그닌 분해효소를 생성할 수 있다. 또, 본 발명의 재설계된 리그닌 분해효소를 이용하면 리그닌 및 멜라닌의 분해 또는 탈색에 이용할 수 있다.

[0025] 그러나 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 MnP6와 LiPH8의 구조를 비교한 것이다.

도 2은 본 발명의 일 실시예로 제작된 효소 변이체와 야생종 LiPH8의 크리스탈 구조를 비교하여 나타낸 것이다.

도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른 제1변이체와 야생종의 반응 전환율을 실험한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 제2변이체와 야생종의 반응 전환율을 실험한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0028] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0029] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0030] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계; 및 상기 선정된 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 제1변이체를 형성하는 단계;를 포함하고, 상기 제1변이체는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합자리에 형성된 이온결합과 동일한 이온결합을 하나 이상 포함하는 것인, 리그닌 분해효소 재설계 방법이 제공된다.

- [0032] 이 때, 상기 리그닌퍼옥시데이즈는 리그닌퍼옥시데이즈H8(LiPH8, PDB: 1B80)일 수 있다.
- [0033] 구체적으로는, 상기 리그닌퍼옥시데이즈H8(LiPH8, PDB: 1B80)은 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 효소일 수 있다.
- [0034] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해효소의 이온결합자리를 선정하는 단계는, 전산모사에 의한 것일 수 있다.
- [0035] 통상적으로 효소 내에 존재하는 아미노산 잔기간의 이온결합은 전체적인 단백질 3차구조를 안정화 시키는 특징이 있다. 이와 같은 특징을 이용하면, 산성조건 또는 높은 온도 조건에서 안정성이 증가하면서, 높은 활성을 유지할 수 있다. 위의 원리를 이용하기 위해, 기존 리그닌 분해효소 잔기에 음이온기와 양이온기를 가지도록 특정위치에 아미노산 잔기를 가지도록 유전자를 조작하여 결과적으로 목표특성을 가질 수 있는 효소를 재설계하였다.
- [0036] 이온결합을 유도할 부위인 이온결합자리를 선정하기 위해서 컴퓨터를 이용하여 여러가지 후보를 추출하고, 추출된 후보 중에서 전체적인 안정성과 동시에 이온결합을 가지는 아미노산 후보군을 최종적으로 도출하였다.
- [0037] 상기 후보를 추출하는 방법에는 조합을 통해 3차원 구조를 구현하고 시뮬레이션을 통해 결과 값을 산출할 수 있는 다양한 예측 프로그램이나 기법이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 전산모사를 이용하여 이온결합자리를 선정할 수 있다. 본 발명에서는 전산모사 기법을 이용하여 산성에서 비교적 안정성을 보이는 망간퍼옥시데이즈에는 존재하면서, 리그닌퍼옥시데이즈에는 존재하지 않는 이온결합자리를 선정하였으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 상술한 방법으로 도출된 아미노산 후보군 중 가장 핵심적인 아미노산으로 확인된 알라닌 16번, 알라닌 55번, 글루타민 156번, 히스티딘239번을 선정하고, 각각을 양이온기 또는 음이온기로 유전공학적인 기법을 이용하여 돌연변이 함으로써, 새로운 이온결합이 형성된 효소 변이체를 획득할 수 있었다.
- [0039] 선정된 여러 후보의 이온결합자리 각각에 신규한 이온결합을 유도하여 변이체를 형성하고, 각각의 변이체의 안정성 및 효소활성을 측정하여 변이 이전보다 안정성이 증가하면서도 효소 활성이 감소하지 않는 변이체를 선별하는 과정을 통해 효소 변이체를 형성하였다.
- [0040] 그 중, 제 1변이체는 전산모사를 이용하여 선정된 이온결합자리 중 어느 하나에 신규한 이온결합을 도입한 것으로, 일 측에 따르면, 상기 제1변이체는, A16E, A55R/N156E 및 H239E 로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0041] 상기 A16E는 선정된 후보 중 A16X-H101의 A16X를 A16E로 돌연변이를 생성함으로써, A16X-H101에는 존재하지 않는 이온결합을 A16E-H101사이에 유도함으로써 생성된 효소 변이체를 의미한다.
- [0042] 구체적으로는, 상기 A16E는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0043] 상기 A55R/N156E는 선정된 후보 중 A55X-N156X를 A55X는 A55R로, N156E는 N156E로 돌연변이를 생성함으로써, A55X-N156X에는 존재하지 않는 이온결합을 A55R/N156E 사이에 유도함으로써 생성된 효소 변이체를 의미한다.
- [0044] 구체적으로는, 상기 A55R/N156E는 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0045] 상기 H239E는 선정된 후보 중 H239X-R234의 H239X를 H239E로 돌연변이를 생성함으로써, H239X-R234에는 존재하지 않는 이온결합을 H239E-R234 사이에 유도함으로써 생성된 효소 변이체를 의미한다.
- [0046] 구체적으로는, 상기 H239E는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0047] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해효소 재설계 방법은, 상기 제1변이체의 이온결합자리에 이온결합을 유도하여 제2변이체를 생성하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 이온결합의 수가 증가할수록, 안정성이 증가될 수 있으므로, 이미 1개의 이온결합자리에 돌연변이가 일어난 제1변이체에 기 선정된 다른 이온결합자리 중 어느 하나 이상에 추가적으로 돌연변이 함으로써 더 강력한 이온결합이 형성된 제2변이체를 형성할 수 있다.
- [0049] 일 측에 따르면, 상기 제2변이체는, A16E-A55R/N156E, A16E-H239E, A55R/N156E-H239E 및 A16E-A55R/N156E-

H239E로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

- [0050] 제2변이체의 생성과정은 전술한 제1변이체의 생성과정과 동일하고, 구체적으로는 제1변이체를 조합하는 과정을 포함한다.
- [0051] 상기 A16E-A55R/N156E는 제1변이체 A16E 및 A55R/N156E를 조합하여 생성된 효소 변이체를 의미한다.
- [0052] 구체적으로는, 상기 A16E-A55R/N156E는 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0053] 상기 A16E-H239E는 제1변이체 A16E 및 H239E를 조합하여 생성된 효소 변이체를 의미한다.
- [0054] 구체적으로는, 상기 A16E-H239E는 서열번호 6에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0055] 상기 A55R/N156E-H239E는 제1변이체 A55R/N156E 및 H239E를 조합하여 생성된 효소 변이체를 의미한다.
- [0056] 구체적으로는, 상기 A55R/N156E-H239E는 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0057] 상기 A16E-A55R/N156E-H239E는 제1변이체 A16E, A55R/N156E 및 H239E를 조합하여 생성된 효소 변이체를 의미한다.
- [0058] 구체적으로는, 상기 A16E-A55R/N156E-H239E는 서열번호 8에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 이온결합자리에 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 이온결합과 동일한 이온결합이 유도되는 재설계 리그닌 분해효소가 제공된다.
- [0060] 상기 재설계 리그닌 분해효소는, 전술한 과정에 의해 생성되는 것일 수 있으며, 상기 이온결합의 유도는 통상적으로 잔기를 치환하거나, 특정 염기를 삽입, 삭제 또는 치환하기 위해 사용되는 유전공학적인 기법이 이용될 수 있으나, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 일 측에 따르면, 상기 재설계 리그닌 분해효소는, A16E, A55R/N156E 및 H239E 중 적어도 어느 하나의 돌연변이를 포함하는 변이체일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 재설계 리그닌 분해효소는, 전술한 과정에 의해 생성된 제1변이체 또는 제2변이체일 수 있으며, 구체적으로는 후술하는 표 2에 기재된 변이체를 의미한다.
- [0063] 일 측에 따르면, 상기 변이체는, 리그닌을 분해하는 용도일 수 있다.
- [0064] 일 측에 따르면, 상기 변이체는, 멜라닌을 분해하는 용도일 수 있다.
- [0065] 일 측에 따르면, 상기 변이체는, 멜라닌을 탈색하는 용도일 수 있다.
- [0066] 상기 제1변이체 또는 제2변이체는 산성조건에서 안정성이 증가하고, 효소활성이 저감되지 않은 분해효능이 개선된 리그닌 분해효소이다.
- [0067] 상기 재설계 과정을 통해 개선된 효능을 나타내는 리그닌 분해효소를 이용하여 리그닌을 분해하거나, 멜라닌을 분해 또는 탈색 할 수도 있다. 구체적으로, 재설계 리그닌 분해효소는, 리그닌을 선택적으로 분해할 수 있어 정밀화학제품의 생산에도 이용될 수 있다.
- [0068] 보다 구체적인 설명은 이하의 실시예를 통해 후술하도록 한다.
- [0070] 실시예 1. 리그닌 분해효소의 이온결합자리 선정
- [0071] 산성에 강한 것으로 알려진 백색부후균(White Rot Fungi, WRF) 중 세리포리옵시스 수브베르미스포라(Ceriporiopsis subvermispora, KUC 8904) 유래의 망간퍼옥시데이즈인 MnP6(PDB: 4CZN)를 기초로 하여, 이와 구조적으로 유사한 파네로케테 크리소스포리움(Phanerochaete chrysosporium) 유래의 리그닌퍼옥시데이즈인 LiPH8(PDB: 1B80)에는 없는 이온결합이면서, 상기 MnP6에는 존재하는 이온결합을 특정하였다.

- [0072] 먼저, MnP6은 강한 산성 조건 하에서 높은 안정성을 나타내는 고유한 특성이 있는데, 이러한 특성은 MnP6의 이온결합 및 수소 결합 네트워크로 인한 것이라는 가설을 세워, 해당 가설이 맞는지 실험을 통해 먼저 검증하였다.
- [0073] 이후, 전산모사를 이용하여 두 효소의 구조를 비교하고, 시뮬레이션을 통해 적합한 이온결합자리를 선정하였다.
- [0074] 보다 구체적인 방법은 아래와 같다.
- [0075] 가설을 검증하기 위해, MnP6 구조 중, pH안정성에 기여하는 이온결합을 탐색하였다.
- [0076] NaCl 0.1M을 첨가한 용매제를 이용하여 용매된 MnP6은 MD 시뮬레이션(Molecular dynamics simulation)을 통해 pH안정성에 기여하는 이온결합을 확인하였다. 이온결합은 리신(Lys), 아르기닌(Arg) 및 히스티딘(His)과 같이 양으로 하전 된 잔기와 아스파르트산(Asp) 및 글루탐산(Glu)과 같이 음으로 전하를 띠는 잔기 사이의 상호 작용에 의해 형성되며, 그 거리는 4Å 이내인 결합을 의미한다.
- [0077] 상기 용매화된 MnP6의 구조는 스마트 미니마이저 알고리즘(Smart Minimizer algorithm)을 이용하여 에너지를 최소화한 뒤, 디스커버리 스튜디오의 스탠다드 다이내믹스 캐스캐이드 시뮬레이션즈(Standard Dynamics Cascade Simulations) 프로토콜을 이용하여 구조를 시뮬레이션 하였다. 마지막으로, 탄도분석(Trajectory Analysis)프로토콜을 적용하여 MnP6의 총 16개의 이온결합이 pH 2.5에서 확인되었다.
- [0078] 확인된 MnP6과 LiPH8을 중첩하여 이온결합의 위치를 확인하면, LiPH8의 1차구조에 8쌍의 아미노산 잔기가 있음이 확인되었으며, 해당 잔기는 이온결합을 형성하고 있지 않은 것으로 나타났다.
- [0079] 도 1은 전술한 내용으로 구조를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [0080] 도 1의 A는 MnP6과 LiPH8의 3D 구조를 겹쳐 구조적 유사성을 확인한 것으로, 옥색의 부분은 MnP6을, 녹색의 부분은 LiPH8의 부분을 의미한다. 도 1의 A에 나타난 바와 같이 MnP6과 LiPH8가 공통의 골격을 공유하고 있어, 효소 간의 구조적 유사성이 매우 높음을 확인할 수 있었다. 또, LiPH에 이온결합이 형성되지 않은 부분 중, MnP6의 이온결합과 동질의 부위도 확인할 수 있었다. 확인된 부위로부터, 총 8쌍의 이온결합자리의 후보를 선정하였다.
- [0081] 이온결합자리의 후보는 하기의 표1과 같으며, 각 후보의 이온결합자리를 변형하여 돌연변이를 유발하였다. 먼저, LiPH8 유전자를 돌연변이한 뒤, 변이된 유전자를 pET21B+ 벡터에 삽입하여 클로닝(cloning)한 것을, 원스텝 PCR(one-step PCR)로 증폭하여 변이체를 제작하였다.

표 1

[0082]

후보	이온결합자리 부위
1	A16X-H101
2	A36X-H39/A180X
3	A55X-N156X
4	D183-G343X
5	E168-A271X
6	Q189X-R337
7	H239X-R234
8	L328X-L299X

[0084]

실시예2. 이온결합자리의 구조적 안정성 확인

[0085]

실시예1에서 선정한 8개의 이온결합자리 후보군 중에서 이온결합을 신규로 생성하는 경우, 도리어 전체적인 분해효소의 안정성을 저해하는 부분도 있을 것이라는 예상을 검증하기 위해, 해당 부분을 선별하는 과정을 수행하였다. 상기, 8개의 후보군에 각각 이온결합을 형성시키고 자유에너지를 계산하였다. 그 결과, 상기 표1의 후보 1 내지 8 중, 5개의 후보(후보 2, 4, 5, 6, 8)는 이온결합 이후, 오히려 구조적인 안정성이 저하되었으며, 3개의 후보(후보 1, 3, 7)는 구조적인 안정성이 증진되는 것으로 확인되었다.

- [0087] 실시예3. 효소 변이체의 산성 안정성 검증 -1
- [0088] 실시예 2에서 구조적인 안정성이 증진된 총 3개의 후보 1, 3, 7에 신규한 이온결합이 형성된 변이체를 이후의 실시예에서는 각각 변이체 A, B, C라고 한다.
- [0089] 변이체 A는 A16X 부위에 A16E 변이를 생성하여 A16E-H101 사이에 이온결합을 유도한 것이고, 변이체 B는 A55X 부위에 A55R 변이를, N156X 부위에 N156E 변이를 생성하여 이온결합을 유도한 것이며, 변이체 C는 H239X 부위에 H239E 변이를 생성하여 H239E-R234 사이에 이온결합을 유도한 것이다.
- [0090] 상기 변이체 A, B, C의 산성조건(pH=2.5)에서의 반감기를 측정하여 안정성을 확인하였다.
- [0091] 확인을 위해, 상기 변이체 3종을 pH 2.5, 25 ℃에서 0.1 M BR 완충액을 용해하였다. 잔류 활성은 BR 완충액 (0.1 M, pH 3.0) 중 과산화수소(H_2O_2) 250 μ M의 존재 하에 189 μ M ABTS의 산화를 측정하여 평가하였다. 활성은 1 분 이내에 420 nm에서 흡광도계수 값이 $420\text{ nm} = 36.7\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ 로 기록되었다. 이후, 데이터를 1 차 플롯에 맞추고 잔류 활성의 자연 대수 (ln) 대 부화 시간 (min)의 선형 관계에 의해 결정된 1 차 속도 상수 (kd)를 분석했다.
- [0092] 그 결과, 세 변이체 모두 안정성이 증가됨을 확인하였다. 안정성 증가는 변이체 C, A, B 순으로 나타났으며, 야생종 효소의 반감기인 9분에 비해 변이체 C는 110분으로 약 12배 정도 크게 증가하였으며, 변이체 A는 67분으로 약 7배 정도 변이체 B는 20분으로 약 2배 증가하였다.
- [0094] 실시예4. 효소 변이체의 산성 안정성 검증 -2
- [0095] 실시예 3에서 1개의 이온결합이 신규로 유도된 변이체에 추가적으로 이온결합을 유도하여 2 이상의 신규한 이온결합을 형성하도록 변이체를 추가 제작하였다. 그 결과, 총 4개의 변이체(변이체 D, E, F, G)가 추가로 제작되었으며, 실시예 3과 동일한 방법으로 변이체 D 내지 G의 산성조건에서의 안정성을 실험하였다.
- [0096] 변이체 D는 변이체 A에 변이체 B를 조합한 것이고, 변이체 E 는 변이체 A에 변이체 C를 조합한 것이고, 변이체 F는 변이체 B에 변이체 C를 조합한 것이고, 변이체 G는 변이체 A, B 및 C를 모두 조합하여 총 3개의 신규한 이온결합을 유도한 것이다.
- [0097] 하기의 표 2는 실시예 3 및 실시예 4의 산성조건에서의 안정성을 실험한 결과를 정리하여 나타낸 것으로, 변이체 A 내지 G의 반감기를 나타낸 것이다.
- [0098] 표 2에 도시된 바와 같이, 추가로 제작된 변이체 4종 중에서는, 변이체 F의 반감기가 113분으로 약 13배의 안정성 증진효과를 보였다. 변이체G의 경우, 반감기가 53분 정도로, 안정성이 증가한 것으로 보이나, 이온결합이 유도된 부위가 3개인 점을 고려할 때, 신규로 이온결합이 유도된 부위가 1 또는 2인 다른 변이체에 비해 안정성의 증가효과가 더 높게 나타나지는 않았다. 즉, 단순히 신규한 이온결합이 많이 유도되는 것이 산성조건에서의 안정성 증가 효과가 더 커지는 것이 아님을 확인 할 수 있었다.

표 2

[0099]

효 소			반감기(분)
야생종			9.06
제1변이체	변이체A	A16E	67.28
	변이체B	A55R/N156E	20.56
	변이체C	H239E	110.00
제2변이체	변이체D	A16E-A55R/N156E	16.38
	변이체E	A16E-H239E	37.46
	변이체F	A55R/N156E-H239E	113.61
	변이체G	A16E-A55R/N156E-H239E	53.31

[0101]

실시예 5. 효소 변이체의 동력학적 활성 측정

[0102]

일반적으로 이온결합을 추가로 도입하여 효소의 안정성을 증가시키는 경우, 효소의 동력학적 활성이 감소하는

경향이 있어, 실시예 3 및 실시예 4를 통해 생성된 총 7종의 변이체 A 내지 G에 대하여, 동력학적 특성을 분석하는 실험을 진행하였다.

[0103] 동역학적 파라미터를 얻기 위해, 산화반응은 베라트릴 알코올(VA, veratryl alcohol)를 기질로 이용하여 수행되었다. VA의 동역학적 반응매개상수는 0.02 μM 효소의 존재 하에 50 내지 2000 Mm의 VA농도에서 수행되었다. 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 250 μM 의 고정 농도로 과산화수소(H_2O_2)를 첨가하여 반응을 시작 하였다. 산화가 되는 30초 동안, 310 nm에서의 흡광도를 분광 광도계로 기록하고, 9.3 mM-1 cm-1의 흡광계수를 사용하여 분해 산물로서 형성된 베라트랄알데히드(VAD)를 정량분석하였다.

[0105] 하기의 표 3은 전술한 방법으로 변이체 7종과 야생종 효소의 동력학적 활성을 측정하여 비교한 것으로, 표 3을 보면 변이체 7종 중, 변이체 A 및 C를 제외한 5종의 경우, 야생종에 비해 더 높은 동력학적 활성이 나타났다.

표 3

효소			K_m (μM)	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{S}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
야생종			121.0 $\pm$ 7.9	10.0 $\pm$ 0.4	82.8 $\pm$ 10.3
제1 변이체	변이체A	A16E	57.2 $\pm$ 5.9	3.4 $\pm$ 0.5	58.6 $\pm$ 2.7
	변이체B	A55R/N156E	141.1 $\pm$ 33.6	12.6 $\pm$ 0.8	92.4 $\pm$ 27.8
	변이체C	H239E	90.6 $\pm$ 11.4	4.9 $\pm$ 0.4	54.5 $\pm$ 10.8
제2 변이체	변이체D	A16E-A55R/N156E	45.4 $\pm$ 9.5	5.5 $\pm$ 0.1	123.5 $\pm$ 25.0
	변이체E	A16E-H239E	53.4 $\pm$ 3.4	7.8 $\pm$ 0.0	145.5 $\pm$ 8.9
	변이체F	A55R/N156E-H239E	59.8 $\pm$ 0.9	9.4 $\pm$ 0.1	157.5 $\pm$ 2.6
	변이체G	A16E-A55R/N156E-H239E	56.8 $\pm$ 1.6	7.6 $\pm$ 0.1	133.3 $\pm$ 3.7

[0107] 특히, 변이체 F의 경우에는, 야생종에 비해 약 2배 높은 동력학적 활성이 확인되었다. 도 2는 상기 변이체 F의 크리스탈 구조를 야생종의 LiPH8과 비교한 것으로, 도 2의 A는 야생종의 LiPH8의 크리스탈 구조, 도 2의 B는 상기 변이체 F인 A55R/N156E-H239E의 구조이다. 도 2를 보면, A55, N156, H239 결합자리 각각에 변이가 진행된 것을 확인할 수 있었다.

[0108] 실시예 6. 효소 변이체의 산성환경 전환율 검증 -1

[0109] 변이체 A 내지 C를 이용하여 산성조건(pH 2.5)에서 기질인 베라트릴 알코올(VA, veratryl alcohol)의 산화실험을 수행한 결과, 앞서 예상한 바와 같이 높은 안정성을 보이면서 동시에 높은 효소 활성을 보인 변이체B가 높은 전환율을 나타냈다. 특히, 야생종의 경우 전환율이 약 10%인 반면, 변이체 B의 경우, 전환율이 약 60%가 넘는 것으로 확인되어, 약 6배 증가되었음을 알 수 있었다. (도 3)

[0111] 실시예 7. 효소 변이체의 산성환경 전환율 검증 -2

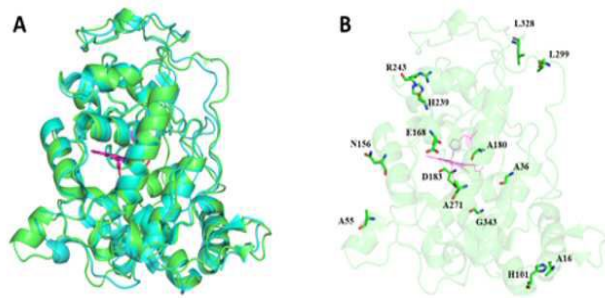
[0112] 변이체 D 내지 G를 이용하여 산성조건(pH 2.5)에서 기질인 베라트릴 알코올(veratryl alcohol)의 산화실험을 수행한 결과, 앞서 예상한 바와 같이 높은 안정성을 보이면서 동시에 높은 활성효소를 보이는 변이체F가 높은 전환율을 나타냈다. 특히, 변이체F는 약 90%가 넘는 전환율을 보여, 야생종의 약 9배 증가된 반응전환율을 나타낼 뿐 아니라, 거의 완전한 전환율을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 4).

[0114] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

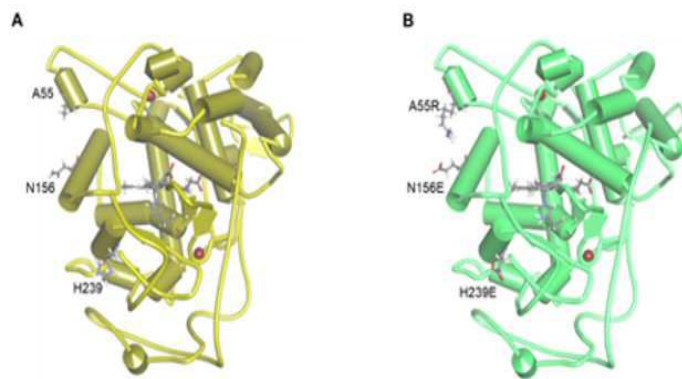
[0115] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

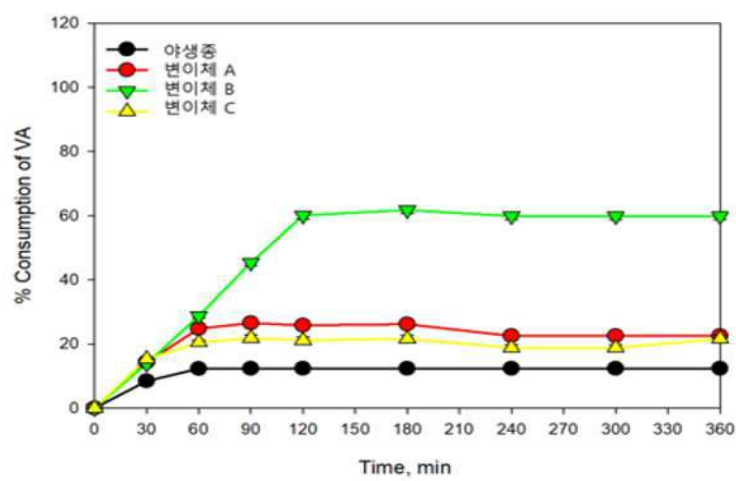
도면1



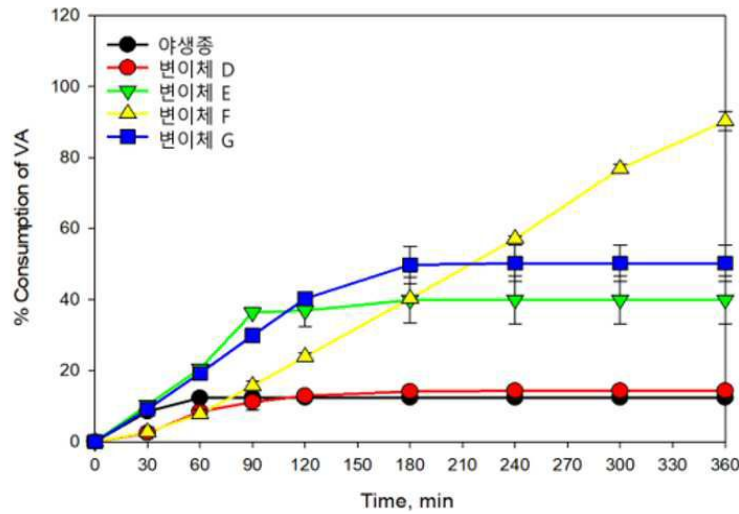
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> UNIST
- <120> Method of redesign degradation enzyme for lignin
- <130> APC-2018-0330
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1059
- <212> DNA
- <213> Phanerochaete chrysosporium
- <400> 1

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggg tggatgatgcg	60
agctgttgtg cgtggttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcggg	120
caatgcgggtg cagaagctca tgaagatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc	180
tccccggcaa tggaagcaca gggtaaattt ggcgggtggcg gtgcagatgg tagcattatg	240
atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgttaaa	300
ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc	360
ggcgcagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaacttttt caccggtcgt	420
gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtccgg aaccgttcca taccgtggac	480
cagattatca acccggttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact gggttgatg	540
ctgagcgcac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca ggtctgccg	600

ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaacca actgcgtggt 660

acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcgaagtgg aatctccgct gccgggtgaa 720

attcgcatcc aatcagatca caccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780

tcatttgtca acaatcaatc gaaactggig gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840

accagctgg gtcaagatcc gaacgccatg acggattgca ggcacgttat tccgcagtct 900

aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttccgg ccggcaaac cattaaagat 960

gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020

acctcggtcc aacgcattcc gccgccgcg ggtgcctga 1059

<210> 2

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A16E

<400> 2

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggg tggatgatgcg 60

agctgttgtg aatggttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcggg 120

caatgcgggtg cagaagctca tgaaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc 180

tccccggcaa tggaagcaca gggtaaatct ggccgtggcg gtgcagatgg tagcattatg 240

atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatattg gcctggatga aatcggtaaa 300

ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360

ggcgcagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaacttttt caccggtcgt 420

gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctgggtccgg aaccgttcca taccgtggac 480

cagattatca accgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact gggtttgatg 540

ctgagcgac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600

ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaacca actgcgtggt 660

acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcgaagtgg aatctccgct gccgggtgaa 720

attcgcatcc aatcagatca caccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780

tcatttgtca acaatcaatc gaaactggig gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840

accagctgg gtcaagatcc gaacgccatg acggattgca ggcacgttat tccgcagtct 900

aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttccgg ccggcaaac cattaaagat 960

gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020

acctcgggtcc aacgcatccc gccgccgccg ggtgcctga 1059

<210> 3

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A55R/N156E

<400> 3

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggt tggatgacg 60

agctgttgtg cgtggttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcgg 120

caatgcgggtg cagaagctca tgaaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc 180

tccccgcgta tggaagcaca gggtaaattt ggcggtggcg gtgcagatgg tagcattatg 240

atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgttaaa 300

ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360

ggcgcagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaacttttt caccggtcgt 420

gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccgg aaccgttcca taccgtggac 480

cagattatcg aacgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg 540

ctgagcgcac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600

ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaaccca actgcgtggt 660

acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcgaagtgg aatctccgt gccgggtgaa 720

attcgcatcc aatcagatca caccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780

tcatttgtca acaatcaatc gaaactggtg gatgactttc agttcatctt tctggcgtg 840

accagctgg gtcaagatcc gaacccatg acggattgca gcgacgttat tccgcagtct 900

aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttccgg ccggcaaac cattaagat 960

gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020

acctcgggtcc aacgcatccc gccgccgccg ggtgcctga 1059

<210> 4

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H239E

<400> 4

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggt tggatgacg 60

agctgttgtg cggtgttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcggg 120
 caatgcgggtg cagaagctca tgaagatc cgctctgggtt tccacgatag tattgcaatc 180

tccccggcaa tggaagcaca gggtaaattt ggcggtggcg gtgcagatgg tagcattatg 240
 atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gccctggatga aatcgtaaa 300
 ctgcagaaac cgtttgtca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360
 ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaactttt caccggtcgt 420
 gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccg aaccgttcca taccgtggac 480
 cagattatca acccggttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg 540
 ctgagcgac acctctgtgc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600

ttcgaatga cgcgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaccca actgcgtggt 660
 acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcaagtgg aatctccgt gccgggtgaa 720
 attcgatcc aatcagatga aaccattgca ctgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780
 tcatttgtca acaatcaatc gaaactggtg gatgactttc agttcatctt tctggcgtg 840
 acccagctgg gtcaagatcc gaacgcatg acggattgca gcgacgttat tccgcagtct 900
 aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc ttttcccg cggcaaac cattaagat 960
 gtggaacaag catgtgtga aacccgttt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccgaa 1020

acctcggtec aacgcatccc gccgcgccg ggtgcctga 1059

<210> 5
 <211> 1059
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A16E-A55R/N156E
 <400> 5

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggg tggatgacg 60
 agctgttgtg aatggttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcggg 120
 caatgcgggtg cagaagctca tgaagatc cgctctgggtt tccacgatag tattgcaatc 180
 tcccccgta tggaagcaca gggtaaattt ggcggtggcg gtgcagatgg tagcattatg 240

atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gccctggatga aatcgtaaa 300
 ctgcagaaac cgtttgtca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360
 ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaactttt caccggtcgt 420
 gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccg aaccgttcca taccgtggac 480

cagattatcg aacgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg 540
ctgagcgcac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600
ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaacca actgcgtggt 660

acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcgaagtgg aatctccgct gccgggtgaa 720
attcgcatcc aatcagatca caccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780
tcatttgtca acaatcaatc gaaactggtg gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840
accagctgg gtcaagatcc gaacccatg acggattgca ggcacgttat tccgcagtct 900
aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttcccg cggcaaac cattaaagat 960
gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020
acctcgggcc aacgcattcc gccgccgccg ggtgcctga 1059

<210> 6

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A16E-H239E

<400> 6

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggg ttgtgatgcg 60
agctgttgtg aatgggtcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcggg 120
caatgcggtg cagaagctca tgaaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc 180
tccccggcaa tggaagcaca gggtaaatit ggccgtggcg gtgcagatgg tagcattatg 240
atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgtaaa 300
ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360

ggcgcagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaacttttt caccggtcgt 420
gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctgggtcccg aaccgttcca taccgtggac 480
cagattatca accgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg 540
ctgagcgcac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600
ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaacca actgcgtggt 660
acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcgaagtgg aatctccgct gccgggtgaa 720
attcgcatcc aatcagatga aaccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780

tcatttgtca acaatcaatc gaaactggtg gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840
accagctgg gtcaagatcc gaacccatg acggattgca ggcacgttat tccgcagtct 900

aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttcccg cggcaaaac cattaaagat 960
 gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020
 acctcggtcc aacgcatccc gccgccgccg ggtgcctga 1059
 <210> 7
 <211> 1059
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A55R/N156E-H239E
 <400> 7

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggt tggatgacg 60
 agctgttgtg cgtggttcga tttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcgg 120
 caatgcggtg cagaagctca tgaaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc 180
 tccccgcgta tggaagcaca gggtaaattt ggcggtggcg gtgcagatgg tagcattatg 240
 atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgtaaa 300
 ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360
 ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaacttttt caccggtcgt 420

gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccg aaccttcca taccgtggac 480
 cagattatcg aacgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg 540
 ctgagcgac actctgtggc agcagttaac gatgtcagc cgaccgtcca ggtctgccg 600
 ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaacca actgcgtggt 660
 acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcgaagtgg aatctccgt gccgggtgaa 720
 attcgatcc aatcagatga aaccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780
 tcatttgtca acaatcaatc gaaactggtg gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840

accagctgg gtcaagatcc gaacccatg acggattgca gcgacgttat tccgagttc 900
 aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttcccg cggcaaaac cattaaagat 960
 gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020
 acctcggtcc aacgcatccc gccgccgccg ggtgcctga 1059
 <210> 8
 <211> 1059
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A16E-A55R/N156E-H239E

<400> 8

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggt tggatgacg	60
agctgttgtg aatggttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcgg	120
caatgcgggtg cagaagctca tgaaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc	180
tccccgcgta tggaagcaca gggtaaattt ggcgggtggcg gtgcagatgg tagcattatg	240
atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgtaaa	300
ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc	360
ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaactttt caccggtcgt	420
gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccgg aaccgttcca taccgtggac	480
cagattatcg aacgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg	540
ctgagcgac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggctctgcc	600
ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaacca actgcgtggt	660
acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcaagtgg aatctccgt gccgggtgaa	720
attcgcatcc aatcagatga aaccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag	780
tcatttgtca acaatcaatc gaaactgggt gatgactttc agttcatctt tctggcgctg	840
accagctgg gtcaagatcc gaacccatg acggattgca gcgacgttat tccgcagtct	900
aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttccgg ccggcaaac cattaagat	960
gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggccggaa	1020
acctcggtcc aacgcatccc gccgccgccg ggtgcctga	1059